

B2



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Numéro de publication: 0 412 883 A1

⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt: 90402224.1

⑮ Int. Cl. 5: C12Q 1/68

⑭ Date de dépôt: 02.08.90

⑯ Priorité: 11.08.89 FR 8910802

Inventeur: Jeanpierre, Marc

94, rue Lecourbe

F-75015 Paris(FR)

Inventeur: Ginot, Frédéric

3, rue des Ebissoires

F-78370 Plaisir(FR)

Inventeur: Martinez, Marie-Christine

2 rue du Colonel Candelot

F-92340 Bourg-la-Reine(FR)

Inventeur: Roussel, Brigitte

63 voie des Sculpteurs, Résidence les

Platanes

F-92800 Puteaux(FR)

Inventeur: Troton, Agnès

12 place Bonsergent

F-75010 Paris(FR)

⑯ Date de publication de la demande:

13.02.91 Bulletin 91/07

⑯ Etats contractants désignés:

AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑰ Demandeur: BERTIN & CIE

Zone Industrielle Boîte postale 3
F-78373 Plaisir Cédex(FR)

⑰ Inventeur: Cohen, Daniel

5, rue Jeanne d'Arc

F-94160 St Mande(FR)

Inventeur: Dufau, Frédéric

9, Hameau de Bois-Fontaine

F-78170 La Celle-St-Cloud(FR)

Inventeur: Hache, Jean

3, allée de l'Epée

F-78960 Voisins le Bretonneux(FR)

⑰ Mandataire: Orès, Bernard et al

Cabinet ORES 6, Avenue de Messine

F-75008 Paris(FR)

⑯ Procédé rapide de détection et/ou d'identification d'une seule base sur une séquence d'acide nucléique, et ses applications.

⑯ Ce procédé est caractérisé en ce que :

(1) on hybridise la séquence sur laquelle se trouve la base à identifier avec un nucléotide de longueur suffisante ;

(2) on débute la synthèse du brin complémentaire de l'hybride obtenu en (1), - ledit nucléotide servant d'amorce -, en présence :

- d'une polymérase sans action exonucléase 3'5'
et

- d'au moins une base nucléotidique modifiée ;

(3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié.

Application : diagnostic des maladies génétiques.

EP 0 412 883 A1

BEST AVAILABLE COPY

PROCEDE RAPIDE DE DETECTION ET/OU D'IDENTIFICATION D'UNE SEULE BASE SUR UNE SEQUENCE D'ACIDE NUCLEIQUE, ET SES APPLICATIONS.

La présente invention est relative à un procédé de détection et/ou d'identification d'une seule base sur une séquence d'acide nucléique, ainsi qu'à ses applications, notamment dans le diagnostic des maladies génétiques et dans le contrôle d'une hybridation.

L'hybridation d'acide nucléique a été utilisée pour étudier l'identité et établir la présence d'acides nucléiques. L'hybridation est basée sur l'appariement de bases complémentaires. Lorsque des acides nucléiques simple brin complémentaires sont incubés ensemble, lesdits acides nucléiques simple brin s'apparentent pour former une molécule hybride double brin. La capacité de l'ADN simple brin ou de l'ARN à former une structure avec une séquence d'acide nucléique complémentaire est utilisée comme méthode d'analyse et de diagnostic. La disponibilité de nucléosides triphosphates radioactifs ayant une activité spécifique importante et le marquage de l'ADN au ^{32}P en présence d'enzymes à fonction polymérase, par exemple la T₄ kinase, a permis d'identifier, d'isoler et de caractériser de nombreuses séquences d'acides nucléiques d'intérêt biologique.

L'hybridation représente un critère important dans la détection de la présence de séquence d'acide nucléique particulières comme par exemple :

- dans les maladies génétiques humaines ou animales où une modification héréditaire du patrimoine génétique a des conséquences morbides (par insertion, délétion ou mutation ponctuelle d'une séquence particulière) ;
- dans les maladies cancéreuses, où des réarrangements de l'ADN génomique sont observés ;
- au cours des infections où l'on décèle la présence de génomes étrangers tels que celui des microorganismes (bactéries, champignons et virus par exemple) ;
- pour l'identification des individus en général : . en médecine légale (paternité, filiation par exemple),
- . dans le domaine agroalimentaire (plantes, contrôle sanitaire par exemple).

Cependant, l'hybridation comme outil de diagnostic peut être limitée par la difficulté de sa mise en œuvre (techniques lourdes) ou par l'absence de spécificité de l'hybridation (protocole opératoire).

En effet, l'étude chimique de l'hybridation a mis en évidence l'influence de la concentration de chacun des brins d'acides nucléiques impliqués, de leurs longueurs, de leurs compositions en bases, de la température, du pH, de la force ionique, de la viscosité du milieu.

La température notamment, est critique et doit rester inférieure à la température de fusion (T_m : température à laquelle 50 % des séquences sont sous forme double brin). En solution, la température optimale d'hybridation est 25 °C en dessous de la T_m pour une sonde de 150 nucléotides et légèrement plus basse pour les sondes plus courtes.

Ainsi lorsque l'on veut détecter un mutation portant sur une seule base, on peut généralement utiliser, selon les cas, deux types de sondes : des sondes d'acide nucléique dites longues, supérieures à 150 nucléotides en général, ou des sondes d'acide nucléique dites courtes entre 17 et 24 nucléotides en général. Si la mutation intervient dans un site reconnu spécifiquement par une enzyme dite de restriction, on peut utiliser la technique de Southern : celle-ci comporte les étapes d'isolement de l'ADN, de digestion par l'enzyme de restriction, d'électrophorèse sur gel, de transfert sur une membrane et d'hybridation à l'aide d'une sonde longue intéressant la région de la mutation ; après lavage et autoradiographie, l'analyse des tailles des fragments obtenus permet d'affirmer ou confirmer la présence de la mutation. Le procédé très lourd nécessite que la mutation intéresse un site de restriction. Si ce n'est pas le cas, on peut synthétiser une sonde courte oligonucléotidique de 17 à 24 nucléotides dont le centre coïncide avec la mutation que l'on veut détecter. En choisissant des conditions appropriées d'hybridation et de rinçage (spécifique de chaque système), on ne peut obtenir une hybridation à l'aide de l'oligonucléotide marqué qu'en cas d'homologie parfaite (une seule différence nucléotidique, notamment à l'endroit de la mutation, entraîne la déstabilisation de l'hybridation).

Cependant, ces différentes méthodes présentent un certain nombre d'inconvénients :

- conditions de température difficiles à maîtriser, pour obtenir une hybridation appropriée ;
- éventuellement présence obligatoire d'un site de restriction ;
- immobilisation de l'acide nucléique sur membrane (Southern blot).

Le Brevet Américain AMERSHAM n° 4 656 127, a permis de pallier certains de ces inconvénients, notamment en ce qu'il permet de détecter une mutation présente à un endroit ne présentant pas de site de clivage par une enzyme de restriction.

Ce Brevet Américain n° 4 656 127, décrit une méthode de détection de la mutation d'une base nucléotique spécifique dans un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) cible par :

- (a) hybridation d'une sonde avec la séquence cible pour former un hybride d'acide nucléique, dans lequel une extrémité de la sonde est hybridée de manière adjacente à la base nucléotidique spécifique ;
- (b) mélange de l'hybride avec un dérivé nucléotidique dans des conditions appropriées à l'elongation de la sonde, de manière à permettre la jonction dérivé nucléotidique - extrémité de la sonde, seulement si la base spécifique dans la séquence cible est (ou n'est pas) la mutation à détecter, une sonde associée audit dérivé nucléotidique étant résistante à une digestion dans des conditions particulières ;
- (c) digestion de l'hybride par une exonucléase dans des conditions telles que le fragment double brin est progressivement digéré à partir de l'extrémité de la sonde à moins que ladite extrémité ait été mise en jonction avec ledit dérivé nucléotidique ;
- (d) élimination des portions de la sonde qui ne sont plus hybridées à la chaîne d'acide nucléique ;
- (e) et détection d'une mutation de la base nucléotidique spécifique dans la séquence cible par détection de la présence ou de l'absence de la sonde après digestion.

Ce procédé implique en particulier en plus de la sonde, l'utilisation d'un dérivé nucléotidique ayant des propriétés particulières et comporte de ce fait encore de nombreuses étapes. De plus, il nécessite, pour sa réalisation, une immobilisation de l'acide nucléique sur une membrane et également un marquage (de la sonde ou du dérivé nucléotidique).

La présente invention s'est en conséquence, donné pour but de pourvoir à un procédé d'identification d'une base nucléotidique spécifique, aisè et rapide à mettre en œuvre, qui répond mieux aux nécessités de la pratique que les procédés de l'Art antérieur, notamment en ce que le procédé conforme à l'invention ne nécessite pas un protocole opératoire complexe, c'est-à-dire ne nécessite ni immobilisation de l'ADN, ni marquage de la sonde, et s'applique à la détection de séquences d'acide nucléique particulières, notamment dans les maladies génétiques, les maladies cancéreuses, les infections, l'identification d'individus humains, animaux ou végétaux.

La présente invention a pour objet un procédé de détection et/ou d'identification d'une base nucléotidique spécifique présente sur une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce que :

- (1) on hybridise la séquence sur laquelle se trouve la base à identifier avec un nucléotide de longueur suffisante pour permettre une hybridation correcte, quelle que soit la température de réaction, ledit nucléotide s'hybridant avec la sé-

- quence cible, de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter et/ou à identifier ;
- (2) on débute la synthèse du brin complémentaire de l'hybride obtenu en (1), - ledit nucléotide servant d'amorce -, en présence :
 - d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' et
 - d'au moins une base nucléotidique modifiée, de manière à être incorporable dans le produit d'extension de l'amorce, ladite incorporation bloquant l'elongation dudit produit d'extension ;
- (3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié, ladite détection permettant d'identifier la base nucléotidique spécifique complémentaire présente sur la séquence cible à analyser.

On entend par nucléotide, au sens de la présente invention, aussi bien un oligonucléotide qui comprend de 10 à 50 bases qu'un nucléotide pouvant comprendre plus de cent bases.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, les bases nucléotidiques bloquantes sont des didésoxynucléotides.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, lesdites bases nucléotidiques bloquantes sont marquées de manière appropriée notamment par un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimioluminescents et des anticorps appropriés.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, le marqueur est identique ou différent pour chacune des bases nucléotidiques bloquantes.

Selon une modalité de cette disposition, lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées à l'aide de marqueurs différents, la détection des quatre nucléotides bloquants est avantageusement simultanée.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées de manière identique ou bien lorsqu'elles ne sont pas marquées, la détection des quatre nucléotides bloquants est réalisée successivement et/ou séparément.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, on détecte, de manière appropriée, le pyrophosphate formé lors de la réaction de polymérisation.

En effet, la réaction de polymérisation génère la production d'un pyrophosphate, comme suit : matrice - amorce + dNTP → matrice - (amorce + dNMP) + PP_i.

En mesurant le pyrophosphate dans chaque tube de réaction, il est possible de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation

s'est produite.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, on détecte chaque base nucléotidique marquée.

En effet, chaque tube de réaction contient, en ce cas, une seule base nucléotidique marquée, les trois autres ne l'étant pas ; la mesure de la base marquée (par fluorescence, radioactivité...) permet de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation s'est produite, les bases marquées non incorporées étant éliminées par lavage.

Le procédé conforme à l'invention a notamment l'avantage de permettre de définir les conditions opératoires, indépendamment de la base nucléotidique à identifier et de ne pas nécessiter d'immobilisation de l'acide nucléique sur une membrane.

La présente invention a également pour objet un kit ou coffret de diagnostic, prêt à l'emploi, pour la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend outre les quantités convenables de réactifs et tampons adaptés à la mise en oeuvre du procédé :

- des quantités appropriées d'un nucléotide (servant d'amorce) capable de s'hybrider avec la séquence cible de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter ;
- des quantités appropriées de quatre bases nucléotidiques modifiées de manière à être incorporables dans le produit d'extension de l'amorce tout en bloquant l'elongation dudit produit d'extension ; et
- des quantités appropriées d'une polymérase sans action exonucléase 3' 5'.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, les bases nucléotidiques modifiées sont des didésoxynucléotides (ddTTP, ddGTP, ddATP, ddCTP).

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, les bases nucléotidiques modifiées sont marquées de manière appropriée notamment par un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimiluminescents et des anticorps appropriés.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, il comprend, en outre, des réactifs appropriés pour le dosage du pyrophosphate.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

5

Exemple 1 : diagnostic de la drépanocytose par le procédé conforme à l'invention (mesure des didésoxynucléotides fluorescents).

10

La drépanocytose ou anémie falciforme est due à une mutation dans l'un des exons du gène β codant pour la chaîne β de l'hémoglobine (Hb). Cette mutation consistant en une substitution d'une adénine (A) par une thymine (T), modifie le codon GAG, traduit en un acide glutamique (en position G) dans l'Hb normale, en codon GTG, traduit en une valine dans l'Hb anormale (HbS). L'ADN qui a été utilisé dans cet exemple correspond à une séquence d'ADN amplifié simple-brin.

a) Blocage des amorces d'amplification.

- 25 * mélanger dans un tube de microcentrifugation, pour chaque ADN matrice :
 - 100 ng d'ADN (simple-brin amplifié)
 - 7 μ l de tampon Sequenase 5X (= Tris-HCl pH 7,5, 200 mM ; NaCl, 250 mM ; MgCl₂, 100 mM)
 - H₂O qsp 22 μ l
- 30 * agiter à l'aide d'un vortex et centrifuger rapidement
 - * incuber au bain-marie à 95 °C pendant 2 minutes.
 - * enlever vite et placer au bain-marie à 37 °C pendant 10 minutes.
- 35 * préparer le tampon de réaction pour un échantillon d'ADN, constitué de :
 - 2,5 μ l DTT 0,1 M
 - 1 μ l d'un mélange de ddNTP, dilué au 1/400 (ddTTP : 112 μ M ; ddGTP : 1,12 μ M ; ddATP : 3,38 μ M ; ddCTP : 8,96 μ M) ; et
 - H₂O qsp 6,5 μ l
 - Séquénase 1 μ l (3 unités)
- 40 * enlever les tubes du bain-marie et centrifuger rapidement,
 - * ajouter le tampon de réaction et mélanger,
 - * placer au bain-marie à 37 °C, pendant 5 minutes,
 - * enlever les tubes et les placer dans la glace.
- 45
- 50

b) Elimination des didésoxynucléotides froids en excès

On utilise les systèmes de microséparation Centriflon 3 ou 10 (Amicon) qui, par filtration sur membrane accélérée par centrifugation, permettent de retenir des espèces moléculaires de poids moléculaire supérieur à 3 000 ou 10 000 Dalton (par

exemple: un nucléotide correspond à 330 D et un oligonucléotide de synthèse de 20 mères correspond à 6 600 D).

- disposer le volume réactionnel issu de a) dans un "Centricon" 3 ou 10 et diluer si nécessaire,
- centrifuger à molns de 5 000 g en suivant les instructions du fabricant, de façon à récupérer un volume minimal,
- inverser le système "Centricon",
- centrifuger pour récupérer le volume réactionnel,
- ramener le volume obtenu à 12 µl.

c) Microséquençage (procédé conforme à l'invention)

- * Pour chaque tube d'ADN, ajouter aux 12 µl :
- 15 ng d'oligonucléotide 5' CATGGTGCACCT-GACTCCTG 3' (OA), correspondant à la séquence s'arrêtant à la base adjacente à la position de la mutation
- 7 µl de Tampon Séquénase 5X tel que défini en a) ci-dessus et procéder comme dans a) ; puis
- * préparer le tampon de réaction constitué pour chaque échantillon de :
- 2,5 µl DTT 0,1 M
- 1 µl d'une dilution au 1/400ème d'un mélange de ddNTP fluorescents (ddTTP* : 112µM ; ddGTP* : 1,12µM ; ddATP* : 3,36µM ; ddCTP* : 8,96µM). Les didésoxynucléotides fluorescents sont vendus par Du Pont (Genesis™ 2000 DNA Analysis System) ;
- H₂O qsp 6,5 µl
- Sequenase 1 µl (3 unités)
- * enlever les tubes du bain-marie, centrifuger rapidement,
- * ajouter le tampon de réaction, mélanger,
- * placer au bain-marie à 37° C, pendant 5 mns,
- * enlever les tubes et placer les dans la glace.

d) Lavage des didésoxynucléotides fluorescents en excès:

- * passer les échantillons sur colonne de Sephadex G50,
- * récupérer les éluats.

e) Détection

La détection se fait pour chaque échantillon après migration électrophorétique et excitation par une source telle qu'un laser. Le signal est analysé par un fluoromètre.

On obtient les courbes a (témoin) et b (malade), comme visible sur la figure 1, qui permet

de détecter au niveau de la position correspondant à une éventuelle mutation, l'incorporation d'un ddATP en a, pour l'individu sain et pour l'individu malade homozygote en b, l'incorporation d'un ddTTP.

10 Exemple 2 : Microséquençage d'une base sur une séquence d'acide nucléique (ADN du bactériophage M13 mp8).

a) Matériel de départ

- 15 * ADN simple brin de bactériophage M13mp8
- * Oligonucléotide de synthèse dit Primer Universel de séquence : 3' TGACCGGCAGCAAAATG5'
- La première base incorporée sur l'amorce dans le sens 5' → 3' est un G.

20

b) Protocole

Le protocole est équivalent au protocole de détection de mutation ponctuelle à partir de l'étape c de l'exemple 1. Les étapes a et b sont inutiles, l'ADN du phage M13 étant non contaminé par des oligonucléotides.

En variante, le protocole est le suivant :

- 30 - 3 µg d'A.D.N. simple-brin M13
- 15 ng d'oligonucléotide primer universel
- 7 µl de Tampon 5X Séquénase
- H₂O qsp 22 µl

La détection révèle l'incorporation sur le primer d'un dideoxy GTP, ce qui correspond au résultat attendu, comme visible sur la figure 2, qui montre les résultats obtenus avec deux dilutions différentes des ddNTP (1/200 (a) et 1/400ème (b)).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mises en œuvres, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarte du cadre, ni de la portée de la présente invention.

Revendications

50 1*) Procédé de détection et/ou d'identification d'une base nucléotidique spécifique présente sur une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce que :

55 (1) on hybridise la séquence sur laquelle se trouve la base à identifier avec un nucléotide de longueur suffisante pour permettre une hybridation correcte, quelle que soit la température de

réaction, ledit nucléotide s'hybridant avec la séquence cible, de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter et/ou à identifier ;

(2) on débute la synthèse du brin complémentaire de l'hybride obtenu en (1), - ledit nucléotide servant d'amorce -, en présence :

- d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' et

- d'au moins une base nucléotidique modifiée, de manière à être incorporable dans le produit d'extension de l'amorce, ladite incorporation bloquant l'elongation dudit produit d'extension ;

(3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié, ladite détection permettant d'identifier la base nucléotidique spécifique complémentaire présente sur la séquence cible à analyser.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les bases nucléotidiques bloquantes sont des didésoxynucléotides.

3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites bases nucléotidiques bloquantes sont marquées de manière appropriée, notamment à l'aide d'un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimoluminescents et des anticorps appropriés.

4°) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le marqueur est identique ou différent pour chacune des bases nucléotidiques bloquantes.

5°) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées à l'aide de marqueurs différents, la détection des quatre nucléotides bloquants est avantageusement simultanée.

6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées de manière identique ou bien lorsqu'elles ne sont pas marquées, la détection des quatre nucléotides bloquants est réalisée successivement et/ou séparément.

7°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on dose, de manière appropriée, le pyrophosphate formé lors de la réaction de polymérisation, ledit dosage de pyrophosphate permettant de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation s'est produite.

8°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on détecte chaque base nucléotidique bloquante marquée.

9°) Kit ou coffret de diagnostic, prêt à l'emploi, pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend outre les quantités convena-

bles de réactifs et tampons adaptés à la mise en œuvre du procédé :

- des quantités appropriées d'un nucléotide, servant d'amorce, capable de s'hybrider avec la séquence cible de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter ;

- des quantités appropriées de quatre bases nucléotidiques modifiées, de manière à être incorporables dans le produit d'extension de l'amorce tout en bloquant l'elongation dudit produit d'extension ; et

- des quantités appropriées d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' .

10°) Kit ou coffret selon la revendication 9, caractérisé en ce que les bases nucléotidiques modifiées sont des didésoxynucléotides.

11°) Kit ou coffret selon la revendication 9 ou la revendication 10, caractérisé en ce que les bases nucléotidiques modifiées sont marquées de manière appropriée, notamment à l'aide d'un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimoluminescents et des anticorps appropriés.

12°) Kit ou coffret selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, des réactifs appropriés pour le dosage du pyrophosphate.

13°) Application du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, à la détection de la présence de séquences d'acides nucléiques particulières associées à des maladies, telles que maladies génétiques ou maladies cancéreuses, à des infections, ou propres à permettre l'identification d'individus humains, animaux ou végétaux.

40

45

50

55

EP 0 412 883 A1

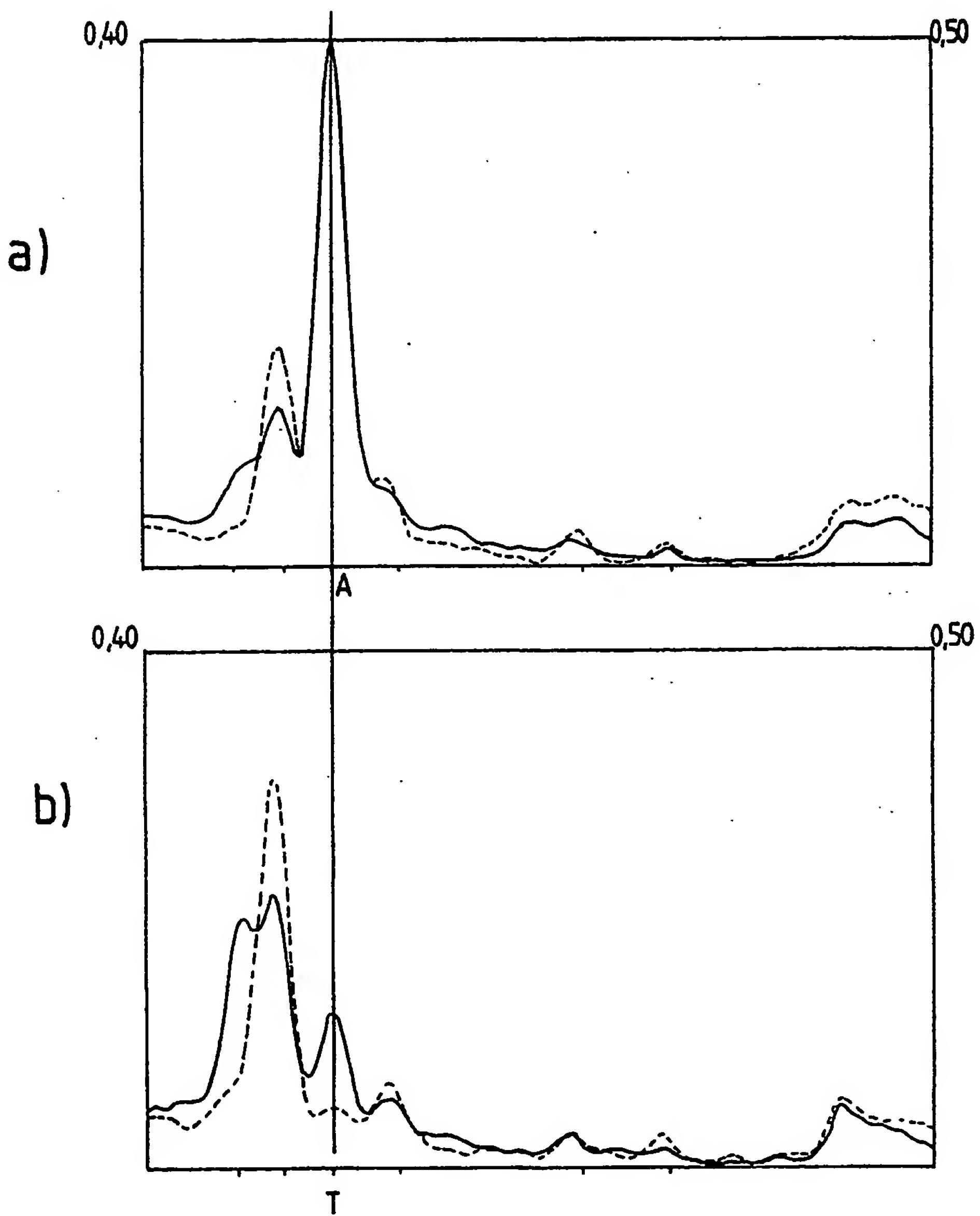


FIG.1

EP 0 412 883 A1

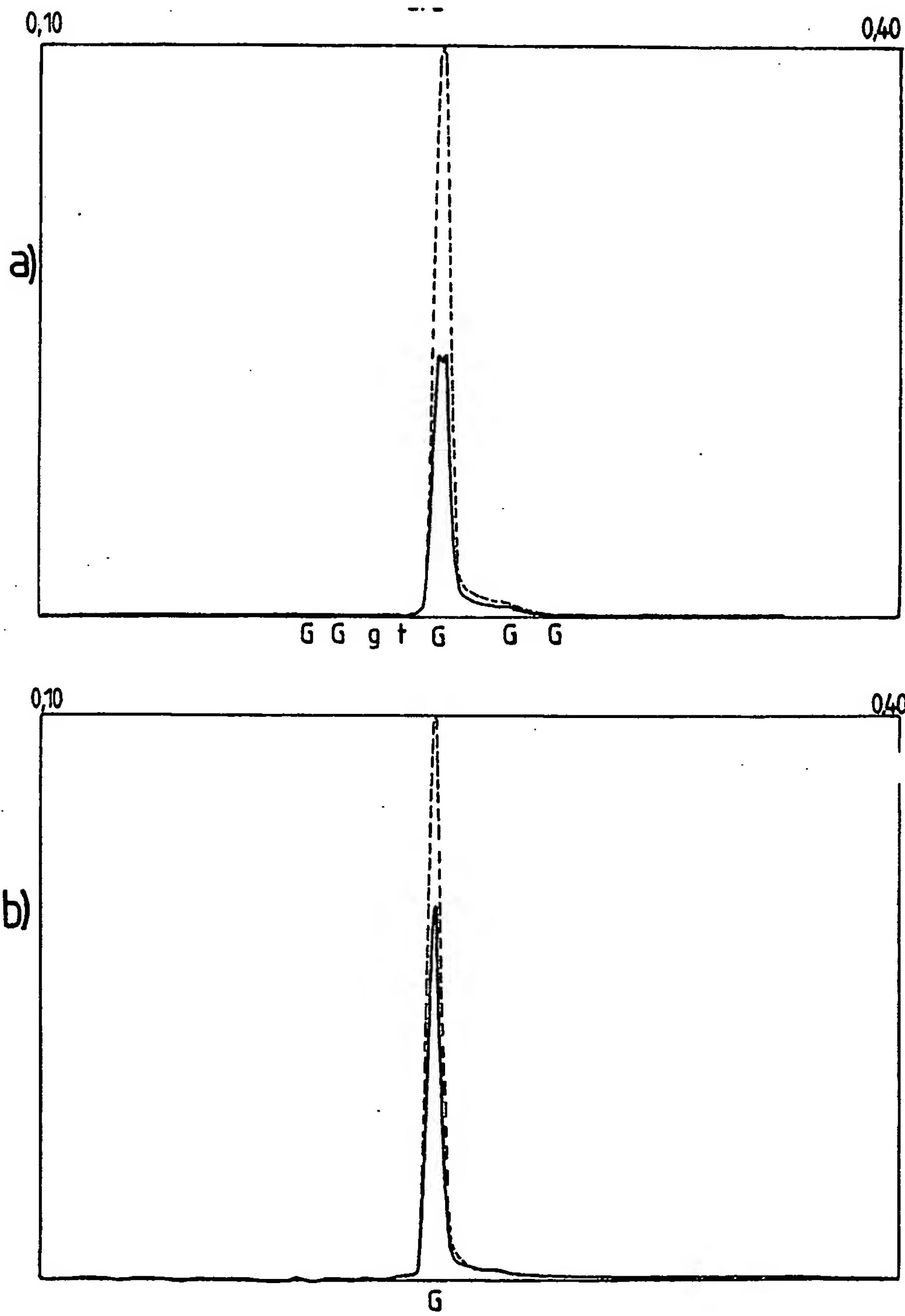


FIG. 2



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE
EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 90 40 2224

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. CL5)		
Y	EP-A-0 223 618 (NEW YORK MEDICAL COLLEGE) * En entier * - - -	1-13	C 12 Q 1/68		
D,Y	EP-A-0 123 513 (AMERSHAM INTERNATIONAL PLC) * En entier * & US-A-4 656 125 - - -	1-13			
A	EP-A-0 141 382 (FUJI PHOTO FILM CO.) * Abrégé; pages 10,11 * - - -	1-11			
A	WO-A-8 805 470 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HAR- VARD COLLEGE) * En entier * - - -	1-11			
P,A	EP-A-0 332 435 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) * Abrégé; pages 2-9 * - - -	1-11			
-			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL5)		
-			C 12 Q		
Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications					
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur			
La Haye	19 novembre 90	OSBORNE H.H.			
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES					
X: particulièrement pertinent à lui seul					
Y: particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie					
A: arrière-plan technologique					
O: divulgation non écrite					
P: document intercalaire					
T: théorie ou principe à la base de l'invention					
E: document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date					
D: cité dans la demande					
L: cité pour d'autres raisons					
S: membre de la même famille, document correspondant					

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.